

Monascus sp. YH-69의 분리동정과 색소의 생산

유춘발[†] · 진영호

대구대학교 공과대학 식품공학과

Isolation and cultural contidtion of *Monascus* sp. YH-69 for the Production of the Pigments

Choon-Bal Yu[†] and Young-Ho Jin

Department of Food Science and Technology, Taegu University,
Naeri 12, Jinryang, Kyungsan, Kyungbook 712-714, Korea

Abstract

The mold YH-69 producing pigments was isolated from soil, and identified as *Monascus* sp.. For the production of the pigments from the mold, the best condition was observed with 6% rice powder with 200 mesh, 0.2% yeast extract, 0.3% ammonium sulfate, and 0.02% ZnSO₄ at pH 5 and 30°C for 6 day with reciprocal shaking.

Key words : *Monascus*, isolation, pigment.

서 론

색소는 천연색소와 합성색소가 있으며, 천연색소는 원료의 지속적 수급이 어렵고 합성색소에 비하여 가공성과 유통중의 안정성도 낮아 주로 합성색소가 사용되고 있다. 그러나 일부 합성색소가 발암성 등의 독성이 확인되어 세계적으로 사용금지되거나 법적으로 사용량을 제한하고 있다¹⁾. 천연색소는 주로 식물성 색소가 많이 알려져 있으며, 주로 치자, 커피, 포도 등의 열매나 잎, 꽃, 뿌리 등에서 추출하여 사용하고 있으나 고가이고 특이한 냄새 등으로 광범위한 사용에는 어려움이 있다^{2,3)}. 최근에는 미생물 발효에 의한 색소생산과 생합성에 관한 연구가 증가하고 있다. 미생물성 색소는 계절에 상관없이 수급이 용이할 뿐만 아니라 대사 조절이 비교적 쉬워 대량생산도 가능하고 비용도 저렴하다.

또한 열, pH, 광선 및 금속이온에도 비교적 안정한 편으로 알려져 있다. 특히 홍국색소를 생산하는 홍국(*Monascus* 속)은 중국에서 홍주 등의 착색제뿐만 아니라 육류의 보관, 소화불량, 근육의 타박상, 설사, 비탈저 등의 치료약제로도 사용되어 왔다^{4,5)}.

본 연구는 천연색소의 개발을 목적으로 자연계로부터 색소생산균을 분리동정하고, 분리균의 색소생산성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균의 분리 및 동정

경북 경산시 일원에서 채취한 토양과 하수 등을 균원시료로 사용하였다. 분리균은 von Arx 등⁶⁾의 분류법에 따라

[†] Corresponding author

속을 분류하였고, Hawksworth⁷⁾의 분류법에 따라 종을 결정하였다. 종의 결정을 위하여 CYA(Czapek yeast extract agar) 배지에서는 25°C에서 배양하고, MEA(malt extract agar), G25N(25% glycerol nitrate agar) 배지에서는 25°C에서 7일간 어두운 곳에서 배양하여 집락의 형태와 검경을 통하여 동정하였다⁵⁾.

2. 배지

색소생산성을 조사하기 위한 기본배지⁸⁾는 3% rice powder, 0.15% NaNO₃, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.25% KH₂PO₄, pH 6의 조성을 사용하였고, 실험의 진행에 따라 배지성분을 계속 조정하였다.

배지에 사용된 쌀은 경북 영천에서 시판중인 대동미를 사용하였고, 쌀가루는 grinding mill로 파쇄한 다음 표준망체(중계상공사, 한국)를 이용하여 입자크기별로 선별하였다.

3. 배양

분리균은 분생자 형성용 배지인 C배지⁹⁾에서 7일간 배양하여 형성된 분생자를 10⁷개/ml로 조정된 후 50% glycerol 현탁액을 만들어 -20°C에 냉동보관하면서 접종에 사용하였다.

색소생산을 위한 배양은 냉동보관중인 분생자 현탁액 1 ml를 250 ml용 삼각플라스크에 들어있는 50 ml의 배지에 접종하고 30°C에서 6일간 150 rpm으로 진탕배양하였다. 배양시간에 따른 색소생산성을 조사하기 위하여 2 l 용 jar fermentor(Tokyo Rikakikai Co., M-100)에 배지 1 l를 넣고 분생자 현탁액 10 ml를 접종하여 1v/v/ml의 통기량으로 30°C에서 300 rpm으로 배양하였다.

4. 색소의 추출 및 정량

균질기를 이용하여 균체배양액을 7,000 rpm에서 30초간 균질화시키고 일정량을 취하여 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음, 그 침전물을 70% ethanol에 희석하고 90분간 진탕하여 색소를 추출하였다. 추출액은 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 500 nm 및 400 nm의 흡광도 값을 각각 적색소 및 황색소로 하였고¹⁰⁾, 결과는 ethanol에 의해 희석된 값을 환산하여 표시하였다.

5. 총당의 정량

총당의 정량은 phenol-H₂SO₄ 법으로 하였다¹¹⁾.

결과 및 고찰

1. 균의 분리

균원시료를 YPD 배지에 도말하여 30°C에서 4-7일간 배양하면서 유색의 집락을 형성하거나 색소를 분비하는 50여종의 미생물을 분리하였다. 분리 미생물을 YPD 액체배지에서 2-5일간 진탕배양하여 적색소 생산성이 가장 양호한 곰팡이 YH-69를 최종적으로 선별하였다.

2. 분리균의 동정

분리균 YH-69를 YPD 액체배양과 슬라이드배양하여 관찰하였다. 그 결과, 격막이 있는 균사의 말단에서 자낭포자와 분생자가 관찰되었으나 병족세포, 가근, 포자낭병 등이 없었다(Table 1). 또한 유성생식의 특성을 관찰한 결과는 자낭포가 불규칙하고, 자낭이 피자기 벽으로 싸여 있으며, 균사의 끝에 1개의 피자기만을 착생함으로 *Monascus*속으로 동정되었다. 종의 분류를 위하여 CYA, G25N, MEA 배지에 배양하여 관찰한 결과, CYA와 G25N 배지에서는 각각 20 mm와 7 mm의 크기로 색소생산이 없었고, MEA 배지에서는 35 mm의 크기로 배양시간이 지남에 따라 콜로니의 뒷면이 점차 황갈색으로 변하였다. 따라서 이러한 특성으로 볼 때 분리균 YH-69는 *Monascus ruber*의 근연균으로 추정되었다.

3. 탄소원의 영향

탄소원이 색소생산성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 3%의 탄소원을 첨가하여 배양하였다. 그 결과, 쌀가루가 다른 탄소원들에 비하여 월등히 우수한 결과를 보였다(Table 2). 이러한 결과는 김 등¹²⁾이 쌀가루가 가장 우수하고 단당류는 거의 효과가 없었다는 보고와는 일치하였으나, Yoshimura 등¹³⁾이 쌀가루는 그다지 효과가 없고 ethyl alcohol과 glucose 등이 아주 효과적이었다는 보고와는 많은 차이가 있었다.

쌀가루 농도의 영향을 조사한 결과, 6%에서 가장 우수한 것으로 나타나 Lin⁸⁾이 5%, 장¹⁴⁾이 9%에서 최적의 생산성을 보였다는 결과와는 약간의 차이를 보였지만 이것은 쌀의 품종과 재배지, 저장기간, 입자크기 등에 의한 영향으로 보여진다(Fig. 1). 또한 7% 이상에서는 생산성이 급격히 감소하였는데 배지의 점성증가로 진탕효과가 감소하여 균의 생육이 저하하였기 때문인 것으로 보여진다.

Table 1. Morphological characteristics of isolated strain YH-69.

Description	
Septate hyphae ; ascospore, conidiospore, and chlamydospore were present ; But, athrospore, zygospor, coremonium, foot cell, rhizoid, and stolon were not present. Ascocarp was formed irregularly, ascospore was covered with the cortex of perithecium, and perithecium was single formed only at the end of hyphae.	
Characteristics of colony on the media	
on CYA : 20 mm(ϕ) ; deeply floccose domed mycelia ; front shape was white, plane, sparse, and deep and entire margins ; back shape was uncolored.	
on G25N : 7 mm(ϕ) ; floccose aerial mycelia ; front shape was white, plane, sparse, and entire margins ; back shape was uncolored.	
on MEA : 35 mm(ϕ) ; little aerial mycelium and floccose aerial growth at center ; front shape was brown at center and white at margins, plane, sparse, and entire and fimbriate margins ; back shape was orange-brown or dark brown at center and white at margins.	

Table 2. Effect of carbon sources on the pigments production.

Carbon sources (3%)	Final pH	Pigments productivity	
		500nm	400nm
Rice powder	3.7	1.31	2.63
Corn starch	5.9	0.29	2.63
Potato starch	5.9	0.17	0.24
Soluble starch	6.0	0.29	0.32
Amylopectin	6.0	0.16	0.24
Dextrin	5.7	0.39	0.49
Maltose	5.9	0.26	0.37
Glucose	6.2	0.35	0.52
Fructose	5.9	0.28	0.28
Glycerol	6.0	0.16	0.21

Basal medium was composed of 0.15% NaNO₃, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.25% KH₂PO₄ with initial pH 6.0. Culture was carried out at 30°C for 6 days.

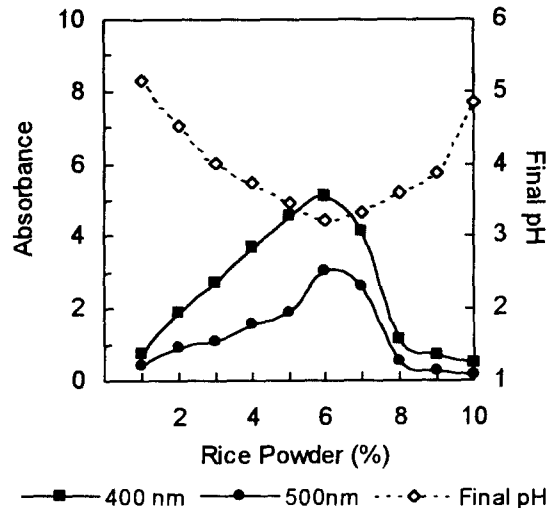


Fig. 1. Effect of the concentration of rice powder on the pigments production

Basal medium was composed of 0.15% NaNO₃, 0.1% MgSO₄, and 0.25% KH₂PO₄ with initial pH6. Culture was carried out at 30°C for 6 days.

쌀가루 입자크기에 따른 영향을 조사하기 위하여 마쇄가 가능한 200 mesh의 크기까지 조제하여 조사하였다. 그 결과, 200 mesh에서 가장 높은 생산성을 보였으며, 입자크기가 작을수록 대체로 생산성이 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 2). 이러한 결과는 김 등¹²⁾이 16-100 mesh에서 비슷한 생산성을 보였다는 보고와는 차이를 보였다.

4. 질소원의 영향

기본배지에 다양한 농도의 질소원들을 첨가하여 생산성을 조사하고, 그 중에서 최적의 생산성을 보인 농도의 질소원만을 Table 3에 나타내었다. Table 3에 나타난 바와 같이 yeast extract, casamino acid, tryptone 등의 저분자성 질소원이 월등히 우수한 것으로 나타났다. 특히 0.2%의 yeast extract를 첨가할 경우 적색소 및 황색소의 생산성이 모두 9.3배 및 6.0배 증가하는 것으로 나타났으며, 이때 C/N비율은 30 : 1이었다. 이러한 결과는 Broder 등¹⁰⁾의 보고와 일치하였으나, 김 등¹⁵⁾이 yeast extract 등의 유기 질소원보다는 NaNO₃ 등의 무기질소원들이 더 효과적이었다는 보고와는 많은 차이가 있었다.

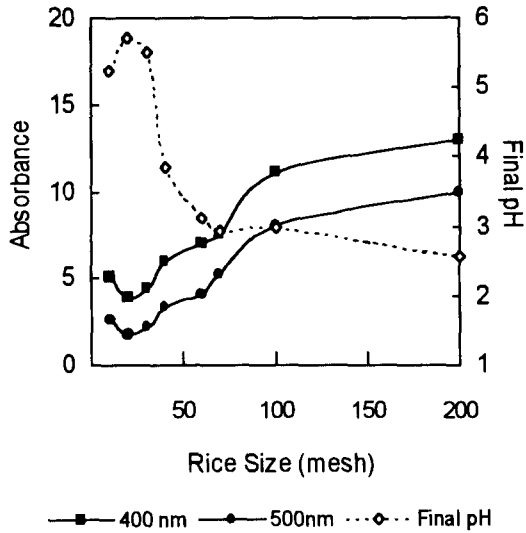


Fig. 2. Effect of the size of rice powder on the pigments production
Basal medium was composed of 6% rice powder, 0.15% NaNO₃, 0.1% MgSO₄, and 0.25% KH₂PO₄ with initial pH6. Culture was carried out at 30°C for 6 days.

Table 3. Effect of nitrogen sources on the pigments production.

Nitrogen sources	Concentr-ation. (%)	Final pH	Pigments productivity	
			500nm	400nm
None		2.7	2.09	3.55
Albumin	0.2	2.7	2.20	4.22
Gelatin	0.2	3.1	1.64	3.37
Casamino acid	0.1	3.1	17.84	20.60
Tryptone	0.1	3.1	15.11	18.51
Yeast extract	0.2	4.0	19.46	21.44
Urea	0.1	4.5	6.68	10.61
NH ₄ NO ₃	0.3	2.2	0.38	2.08
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	2.4	0.35	1.05
NaNO ₂	0.1	3.8	0.31	0.48
NaNO ₃	0.1	3.6	5.16	6.38

Basal medium was composed of containing 6% rice powder, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.25% KH₂PO₄ with initial pH 6.0. Culture was carried out at 30°C for 6 days.

5. 인산염의 영향

인산염은 모든 생물의 ATP, NADPH, DNA 등을 구성하는 중요한 생육인자이다. 그래서 인산염에 의한 색소생산성을 조사한 결과, 0.3% NH₄H₂PO₄를 사용하였을 때 가장 우수한 것으로 나타나 김 등¹²⁾이 KH₂PO₄가 더 효과적이었다는 보고와는 차이가 있었다(Table 4).

Table 4. Effect of phosphates on the pigments production.

Phosphates (0.3%)	Final pH	Pigments productivity	
		500nm	400nm
None	3.9	12.67	17.93
NH ₄ H ₂ PO ₄	3.3	21.11	25.704
KH ₂ PO ₄	4.0	13.20	19.21
K ₂ HOP ₄	3.9	12.60	20.16
NaH ₂ PO ₄	4.0	8.14	11.95
Na ₂ HPO ₄	3.9	9.16	14.22
Na ₂ HOP ₄	4.0	6.97	11.57

Basal medium was composed of containing 6% rice powder, 0.2% yeast extract, and 0.1% MgSO₄ · 7H₂O with initial pH 6.0. Culture was carried out at 30°C for 6 days.

6. 무기염의 영향

무기염에 의한 영향을 조사한 결과, Zn²⁺가 가장 우수하였고, Mg²⁺도 좋은 효과를 보임에 따라 김 등¹²⁾이 Mn²⁺이 가장 좋은 효과를 보였고 Zn²⁺는 아주 낮았다고 하여 본 조사와는 약간 달랐다. 또한 Zn²⁺의 농도에 의한 영향을 조사한 결과, 0.02%에서 가장 우수한 것으로 나타났다(자료 미제시).

이상의 결과들을 종합하여 200 mesh의 6% 쌀가루, 0.2% yeast extract, 0.3% NH₄H₂PO₄, 0.02% ZnSO₄ · 7H₂O의 조성으로 최적배지를 구성하고 다음의 물리적 생산조건을 조사하였다.

7. 초기배양 pH의 영향

Carels 등¹⁶⁾은 pH가 *Monascus*의 색소생산과 분생자형성에 중요한 요소라 하였다. 따라서 초기배양 pH에 의한 색소생산성을 조사한 결과는 pH 5에서 가장 효과적이었다

(Fig. 3). 이러한 결과는 pH 4.5에서 최적 생산성을 보였다는 장 등¹⁴⁾의 보고와 유사하였으나, Lin⁸⁾의 pH 6과 Yoshimura 등³⁾의 pH 6.5에서 최적 생산성을 보였다는 보고와는 약간의 차이를 보였다.

Table 5. Effect of metal ions on the pigments production.

Metal ions (0.1%)	Final pH	Pigments productivity	
		500nm	400nm
None	3.1	15.53	22.20
Li ₂ SO ₄	2.6	2.47	5.12
Na ₂ O ₄	2.2	1.89	5.28
CuSO ₄	4.1	0.08	0.19
FeSO ₄	2.2	0.89	3.08
MgSO ₄	2.2	19.09	24.01
MnSO ₄	2.2	6.09	18.07
ZnSO ₄	2.2	21.12	28.19

Basal medium was composed of containing 6% rice powder, 0.2% yeast extract, and 0.3% NH₄H₂PO₄ with initial pH 6.0. Culture was carried out at 30°C for 6 days.

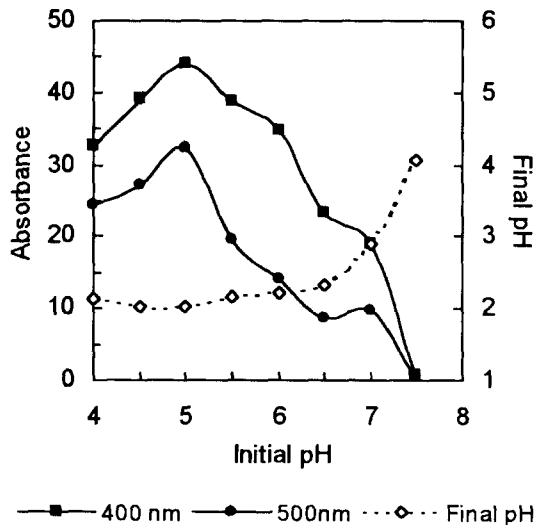


Fig. 3. Effect of initial pH on the pigments production. The mold YH-69 was cultured in the medium containing of 6% rice powder, 0.2% yeast extract, 0.3% NH₄H₂PO₄, 0.02% ZnSO₄ · 7H₂O at pH 6 and 30°C for 6 days.

8. 배양온도의 영향

Su¹⁷⁾는 배양온도에 따라 균체의 증식방법이 변화되고 색소생산성에도 영향을 준다고 보고하였다. 따라서 배양온도의 영향을 조사한 결과, 황색소는 28-37°C의 넓은 범위에서 높은 생산성을 보였으나, 적색소는 28-30°C의 좁은 범위에서 높은 생산성을 보였다(Fig. 4). 그러나 지금까지 진행된 실험의 모든 조건에서는 대부분 황색소와 적색소가 일정비율로 생산되었지만, 본 실험에서는 온도에 따라 각 색소의 생산성이 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 Su¹⁷⁾는 45°C 이상에서는 색소생산이 없고 분생자만 형성될 뿐 폐자기도 거의 형성되지 않는다고하여 본 연구와 일치하는 것으로 나타났다.

9. 배양시간의 영향

Jar fermentor를 이용하여 배양시간에 따른 생산성을 조사한 결과, 배지내의 쌀가루로부터 유래한 것으로 추정되는 총당의 농도는 배양 1일경부터 급격히 감소하였으나 3

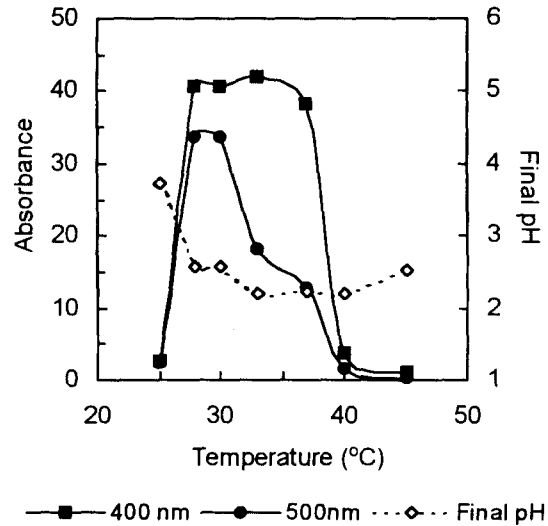


Fig. 4. Effect of temperature on the pigments production.

The mold YH-69 was cultured in the medium containing of 6% rice powder, 0.2% yeast extract, 0.3% NH₄H₂PO₄, 0.02% ZnSO₄ · 7H₂O at pH 6 and 30°C for 6 days.

일경부터는 완만히 감소하였다(Fig. 5). 그러나 색소생산성은 배양 3일경부터 급격히 증가하여 6일경에 최고의 생산성을 보였으며, 또한 pH는 배양시간의 경과에 따라 상당히 감소하여 배양 6일경에는 pH 2.1정도의 높은 산성으로 나타났다.

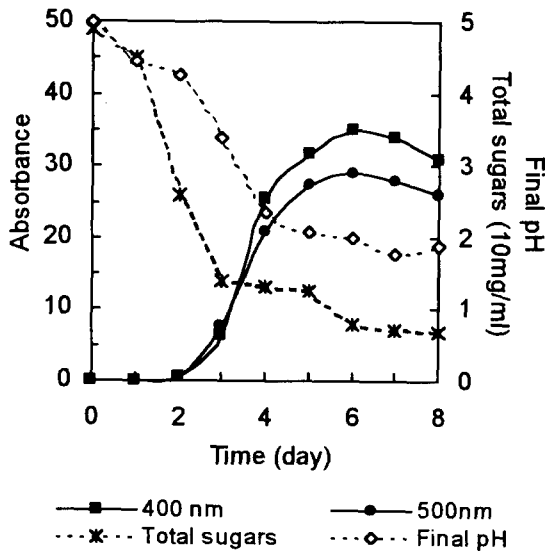


Fig. 5. Effect of culture time on the pigments production

Cultivation was carried out in 1 l of the medium, composed of 6% rice powder, 0.2% yeast extract, 0.3% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.02% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, in 2 l jar fermentor at pH 5 and 30°C for 8 days.

요 약

자연계로부터 색소생산균을 분리하고 색소 생산성이 가장 양호한 YH-69를 동정한 결과, *Monascus ruber*의 근연균으로 동정되었다. 분리균의 색소 생산성을 분석한 결과, 탄소원은 200 mesh의 6% 쌀가루가 가장 우수하였으며, 질소원은 0.2%의 yeast extract, 인산염은 0.3% ammonium sulfate, 무기염은 0.02% ZnSO_4 에서 높은 생산성을 보였다. 가장 높은 생산성을 보인 인자들을 조합하여 최적 배지를 구성하고 색소생산성을 조사한 결과, pH 5와 30°C

에서 높은 생산성을 보였으며, 배양 3일째부터 색소생산성이 증가하여 배양 6일째 최고의 생산성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. 한국식품공업협회 : 식품첨가물 공전, pp.1076-1077 (1994).
2. Yamakawa, T., Ishida, K., Kato, S., Kodama, T., and Minoda, Y. : Formation and identification of anthocyanins in cultured cells of *Vitis* sp.. *Agric. Biol. Chem.*, 47(5), pp.997-1001(1983).
3. Hanagata, N., Ito, A., Fukuju, Y., and Murata, K. : Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus tinctorious* L. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(1), 44-47(1992).
4. 遠藤 章 : 紅麴と紅麴菌をめぐる歴史的と最近の動向. *醸酵と工業*, 43(6), 544-552(1985).
5. Wong, H. C. and Koehler, P. E. : Production and isolation of an antibiotics from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. *J. Food Sci.*, 46, 589-592(1981)
6. von Arx J. A. : The genera of fungi sporulating in pure culture, 3rd ed., pp.1-140, *Germany J. Cramer* (1981).
7. Hawksworth, D. L. and Pitt, J. I. : A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural microscopical character. *Aust. J. Bot.*, 31, 51-61(1983)
8. Lin, C. F. : Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *J. Ferment. Technol.*, 51(6), 407-414 (1973).
9. 廣井忠夫, 高橋 剛, 嶋 悌司, 鈴木恒夫, 月岡 本, 小笠原長宏 : 固 培養による紅麴の生産. *日本農藝化學會誌*, 55(1), 1-6(1981).
10. Broder, C. U. and Koehder, P. E. : Pigments produced by *Monascus purpureus* with regard to quality and quantity. *J. Food Sci.*, 45, 567-569(1980).
11. Dubios, M., Gilles, K. A., Mamilton, J. K., Reber, P. A., and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.*, 28, 350(1956)

12. 김명희, 이태경, 양한철 : *Monascus anka albidus*의 적색 색소 생산. 한국식품과학회지, **24**(5), 451-455(1992).
13. Yoshimura, M., Yamanaka, S., Mitsugi, K., and Hirose, Y. : Production of *Monascus*-pigment in a submerged culture. *Agric. Biol. Chem.*, **39**(9), 1789-1795(1975).
14. 장욱, 김현수, 손충홍, 배종찬, 유주현 : *Monascus* sp.가 생산하는 황색색소에 관한 연구 ; 제1보, 황색색소 생산의 배양조건. 한국산업미생물학회지, **8**(2), 119-123 (1980).
15. 김현수, 김두현, 양호석, 변용호, 유주현 : 액체진탕 배양에 의한 *Monascus* sp.가 생산하는 적색색소에 관한 연구 ; 제 1보, 균주의 분리 및 색소생산 배양조건. 한국산업미생물학회지, **7**(1), 23-30(1979).
16. Carels, M. and Shepherd, D. : The effect of pH and amino acids on conidiation and pigment production of *Monascus major* ATCC 16362 and *Monascus rubiginosus* ATCC 16367 in submerged shaken culture. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 1346-1357(1978).
17. Su, C. Y. : Fermentative production of Anka-pigments(*Monascus*-pigments). *Kor. J. Appl. Bioeng.*, **11**(4), 325-337(1983).